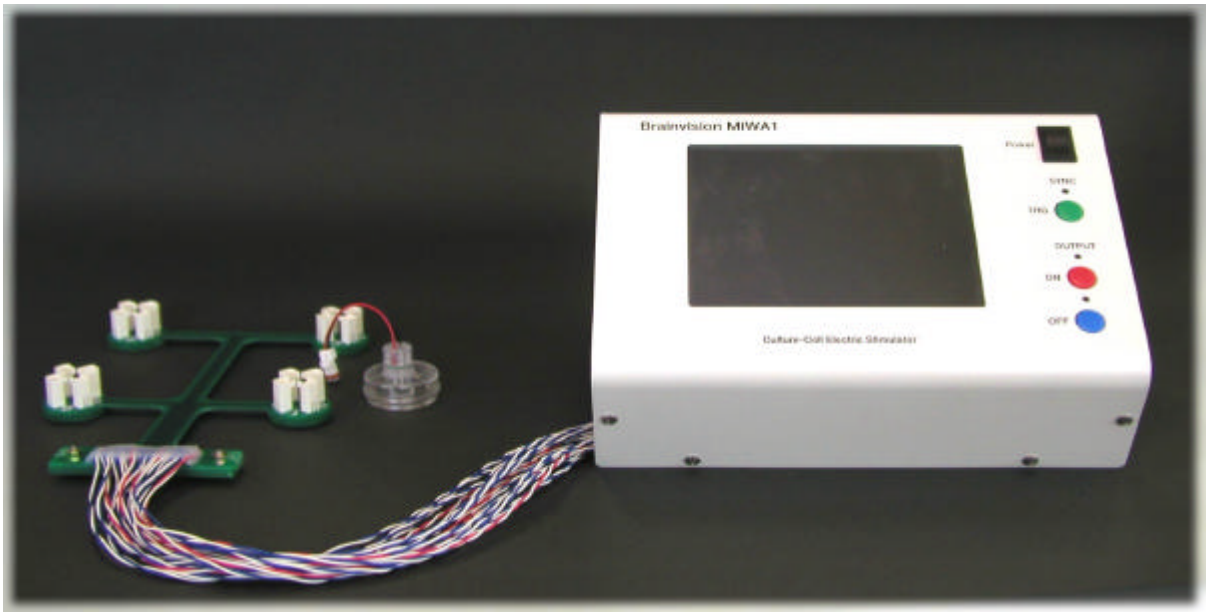
培養細胞電気刺激装置　MiWA1
取扱説明書



この装置は基礎科学研究用です。

医療用としては使用できません。

暫定版　2005 年 10 月

ブレインビジョン株式会社

小型 CO2/O2 インキュベータとの組み合わせ例

はじめに

この度は、当社製品 MiWA1 のご採用、誠にありがとうございます。

MiWA1 は培養中の細胞に電気刺激を与えるために使います。培養技術およびインキュベータ等の装置についてはお客様の研究室のものをそのまま使えるように配慮してあります。

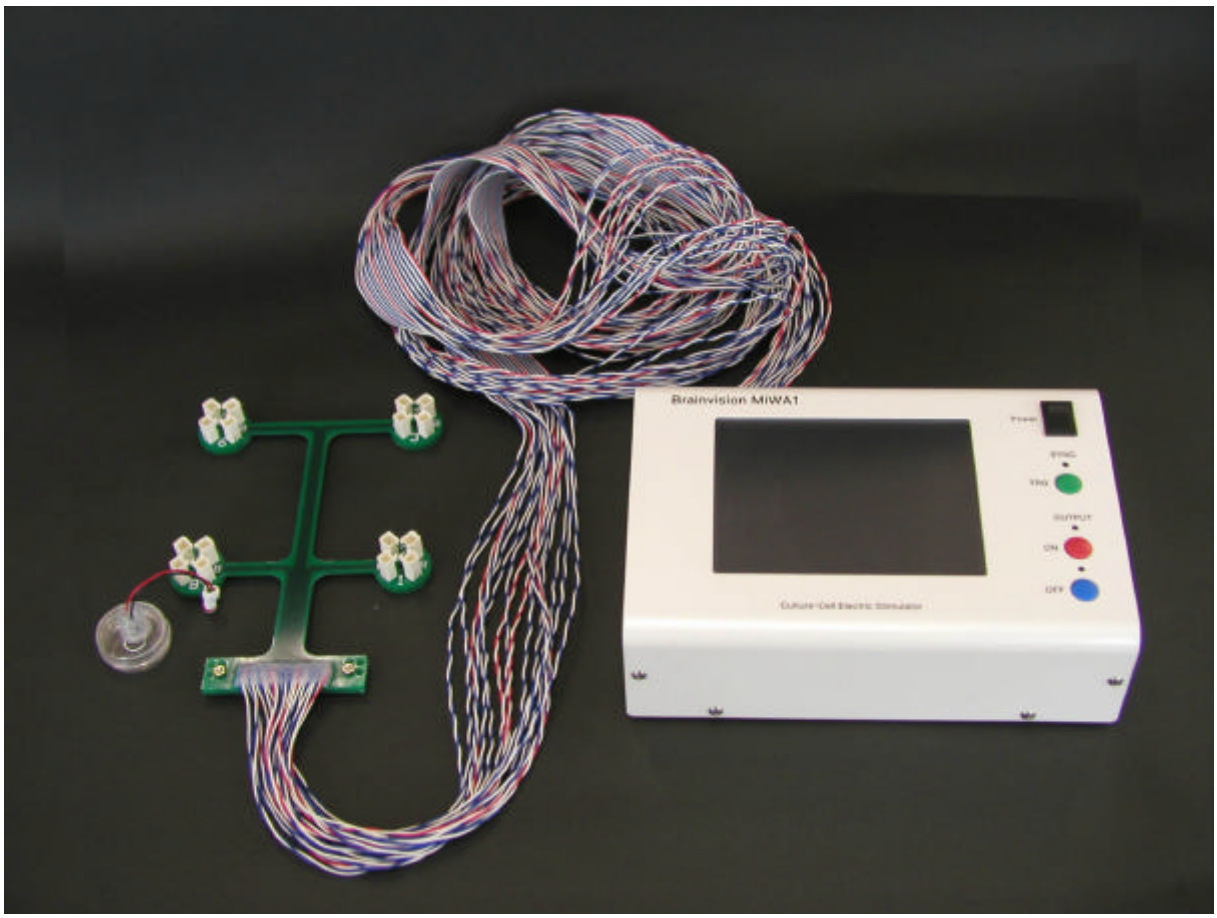
インキュベータ内の多湿環境で電気を扱うという行為自身が感電の危険を伴う行為です。どなたでも安心してご使用頂けるように十分配慮して設計されていますが、絶対に安全ということはありえません。以下の注意を必ずお守りください。また、感電についての基本的な知識について、ご理解の上で使用ください。（乾燥状態で 30V 以下、多湿状態で 12V 以下が安全、通電電流 3.5 mA 以下では電気ショックがあっても、無害と言われています。）

１．チェンバー部の接続な配線操作時には必ず電源を切ってください。
２．培養用のインキュベータは必ずアースを取ってください。
３．端子部に水滴がついた時は、電源を切り、水気を良く拭いてください。
４．もし、感電を知覚したら、すぐに使用を中止して、ご連絡下さい。
５．刺激装置の操作を濡れた手で行うと故障や感電の危険があります。
６．絶対に刺激装置をインキュベータ内に入れないでください。

安全のため 25V/1.2mA までの容量結合出力（直流絶縁出力）となっています。通常使用では健康に有害な感電は起こりません。しかし、刺激装置本体が濡れると内部回路の故障から大電流が流れ、有害な感電事故に至る危険があります。

本装置は理化学研究所の特許使用認可を受け、当社が設計製造したオリジナル製品です。

１．セットの内容



製品には、写真のように、刺激装置本体、チェンバー（8 個/16 個)、接続端子台（ケーブル付き)、電源アダプタ（写真にはありません）がセットされています。不足がないか確認してください。それぞれについて簡単に説明します。

１－１．刺激装置本体

8 チャンネルの独立した電気刺激パルスを発生させることができます。刺激パルスはタッチパネルの簡単操作で自由に設定することができます。

１－２．チェンバー

35mm のプラスチック培養容器（WPI-500861）に白金線のループ電極と刺激針を取り付けてあります。電極は位置調整と取り外しが可能です。

１－３．接続端子台

インキュベータの棚板に付属のネジで固定して使います。ケーブルをインキュベータの外に通す時は、インキュベータの背面などのサービスホールをコネクタ側から通してください。

１－４．電源アダプター

５V/3.5A の AC 電源アダプタです。本体の背面パネルの電源端子に接続します。

１－５．付属品類（試作機には付属品は添付されていません）

予備の培養容器、予備電極、穴あけ用ゲージ、取り付けネジ、CD-ROM などの標準添付品

２．概要と特徴

２－１　チェンバーと電極

チェンバーは一般的に良く使われる 35mm タイプのプラスチック培養容器に適合しますが、製品では WPI 社の 12mm ガラス底タイプ製品（注文コード 500861)を使用して電極支持器具を取り付けてあります。お客様が異なる容器をご希望の場合はご自分で穴空け加工を行って、取り付けます。電極は可動式で、チェンバー上方のイモネジを時計回りに回すことで電極を押し出すことが出来ます。チェンバーの電極は 1 端がループ電極、他端が中心の刺激針です。刺激針から注入される電流は同心円状に広がり、ループ電極内を流れます。当然ですが中心ほど電流密度は高いので、完全に均一な刺激を与えることはできません。それでも経験的にこの電極構造は比較的効率良くループ内の細胞を刺激することが分かっています。電極の抵抗は生理食塩水に対して、約 1ｋΩです。電極の線材は 999 の白金線であり、表面の絶縁塗装にはテフロン樹脂を用いていますので、耐薬品性、無毒性に優れています。

２－２　電気刺激

電気刺激パルスを発生する本体には最大 25Ｖの正負の電気パルスを発生する能力があります。電圧は 0V から 25V の範囲で 0.1V の分解能で正確に設定できます。出力端の直列抵抗は 20kΩですので、最大で 1.25mA の電流を刺激電極間に流すことが出来ます。正確に電圧から電流を換算するには電極の抵抗を測定して計算すべきですが、大雑把に言って、この電極とのセットでは、電圧の V を 1/20 した値を mA に換算すれば概数となります。また、出力には直列に耐圧 100V の 0.1μF のコンデンサを入れてありますので、直流的な漏れ電流は生じません。感電する危険性を下げるため、出力は差動で同じ振幅の正パルスと負パルスを電極間に与えています。ですから、直接に接触しない限りリーク電流で感電することは殆どありません。(直接に一方の電極端を触った場合、グランドに向けて 12.5V、1.25mAMAX の電流が流れますので、電極部を直接触る可能性がある操作は必ず OFF にしてから行ってください。)

電気刺激の強度は、振幅電圧（電流）とパルス幅の積で決定されます。つまり、振幅が大きく、時間が長いほど強烈な刺激が細胞に与えられます。一般に 0.5msec 以上のパルス幅では細胞にダメージがあると言われています。最も典型的な刺激としては、10V（0.5mA)、0.25msec などで良い結果が得られます。なお、電極の分極を防ぐため、多くの場合、逆極性パルスを交互に与えるバイポーラ刺激を推奨します。本装置はバイポーラ刺激機能を装備しています。

２－３　パルス設定

8 チャンネルのパルス発生機構は互いに独立に動作します。例えば、１チャンネルを１KHz に設定し、２チャンネルを２.３KHz に設定するということが可能で、互いに干渉はありません。各チャンネルは２つの出力に分岐されており、最大で１６個の培養チェンバーに同時に 8 種類の異なる刺激を与えることが出来ます。多彩なタイミングとトリガ設定が可能なので、非常に複雑なパルス列を設定することも可能ですが、通常用いる連続周波の刺激パルスやバーストパルスは簡単に設定できるように配慮されています。また、外部トリガによる全チャンネル同期動作も可能ですので、色素イメージングなどによる観察用の刺激装置としても利用できます。

電極抵抗や端子の接触不良を知る目的のモニター機能を内蔵しています。20kΩの直列抵抗を経て出力される電極端の電圧を内蔵の簡易デジタルオシロにより観察することが出来ます。また、

同時に外部オシロスコープ用のアナログ出力と同期用出力を備えています。このため、通電状態を常に観察することが可能です。モニターチャンネルはタッチパネルで切り替えが可能です。

２－４　タイマー機能

細胞培養の実験過程では、2 時間後に、6 時間の刺激をしたいというような状況が頻繁にあります。この間、じっと待っているのは苦痛ですので、本装置には ON タイマーと OFF タイマーの機能が装備されています。家電製品のエアコンや炊飯器などのタイマー機能と似ています。但し、24 時間を越える設定は出来ません。また、30 分間毎に ON/OFF を繰り返したいというような長い周期を与える間欠動作（IMW）の設定も可能です。タイマー機能は全チャンネルに共通です。（各チャンネル独立にタイマーを設定することは出来ません。）

２－５　端子台と注意事項

CO2/O2 インキュベータの内部は多湿環境ですので、防水構造の端子台がセットには含まれます。この枝状のプリント配線基板を付属のネジを使って、インキュベータのステンレス棚板などに固定して使います。チェンバーに接続するコネクタは防滴構造になっています。（差し込んであるものは湿気が入ることは少ないと思われますが、空いているコネクタには湿気が入りリーク電流や端子腐食が起きる可能性があります。開いたコネクタ端子はパラフィルムなどで蓋をして下さい。）コネクタを抜き差しする時に容器の蓋が外れるなどの失敗を防ぐため、容器と蓋はチェンバー側面を簡単にテープなどで固定することをお薦めします。

インキュベータ内への配線はケーブルをサービスホール（穴）などに通すことで行います。穴がない場合には、インキュベータメーカーにお問い合わせ下さい。場合によっては、ドアのゴム部の隙間にフラットケーブル部分を上手く挟むこともできます。

２－６　本体の操作とインターフェース

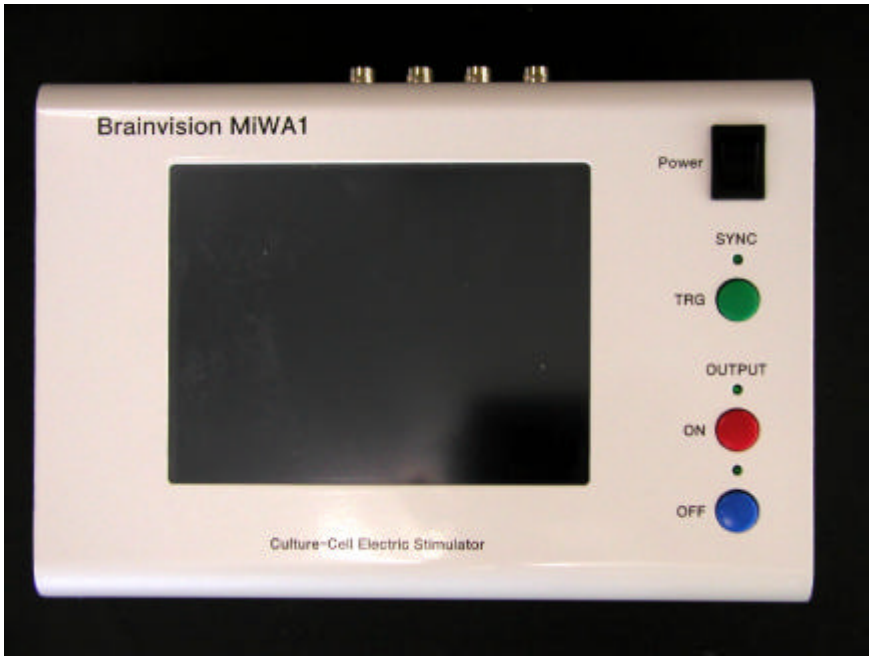
本体の設定は全て液晶タッチパネルで行うことができます。直感的な操作性を重視していますので、一度、マニュアルを見ながら操作すれば、以後、マニュアルは殆ど不要でしょう。タッチパネルは指先を軽く立てて、チョンという感じで触れると正確に感応します。指の腹でゆっくりとギュッと押すと感応しないことがあります。また、液晶パネルユニットに内蔵されている CPU の演算能力の限界から、操作に若干の遅れが感じられることがありますが、故障ではありません。１つの操作での動作を確認しつつ焦らずに操作ください。本体のパネル右側の出力 ON/OFF ボタンはハード的なスイッチです。パネルやソフトからは制御できません。通常 ON でお使い下さい。

また、本装置には USB インターフェースを装備しています。タッチパネルで出来るほぼ全てのことは USB を介して PC 上からも操作できます。（ソフトウェアの準備中です。）PC からはさらに高度な設定や綿密な波形表示、それらのディスク保存などが可能です。なお、アップグレードにより機能は拡張されて行く可能性があります。アップグレード情報は WEB サイトでの告知後に販売会社から連絡が参りますので、よろしくご対応ください。アップグレード自身は無償ですが、手数料及び送料などをご負担頂くことがございますのでご了承下さい。

３　刺激装置のハードウェア

刺激装置は本装置の中心の部分であり、8 チャンネルの独立なパルス発生機能を備えています。

３－１　刺激装置の前面パネルとスイッチなどの説明



液晶タッチパネルを中心に、右側にスイッチ類があります。
スイッチは上から、
電源スイッチ（黒）
トリガボタン（緑）
出力 ON ボタン（赤）
出力 OFF ボタン（青）、
ランプは上から、
同期確認ランプ
出力パルス確認ランプ
出力状態表示ランプ。

電源スイッチを入れると、ランプ類が点灯し、液晶画面に当社ロゴマークが表示され、約 30 秒後に使用可能な状態になります。電源スイッチを ON/OFF する際には、ロゴが消え、ホーム画面が現れるまで待って OFF してください。ロゴマーク表示中に OFF するとフラッシュメモリ内容が壊れることがあります。

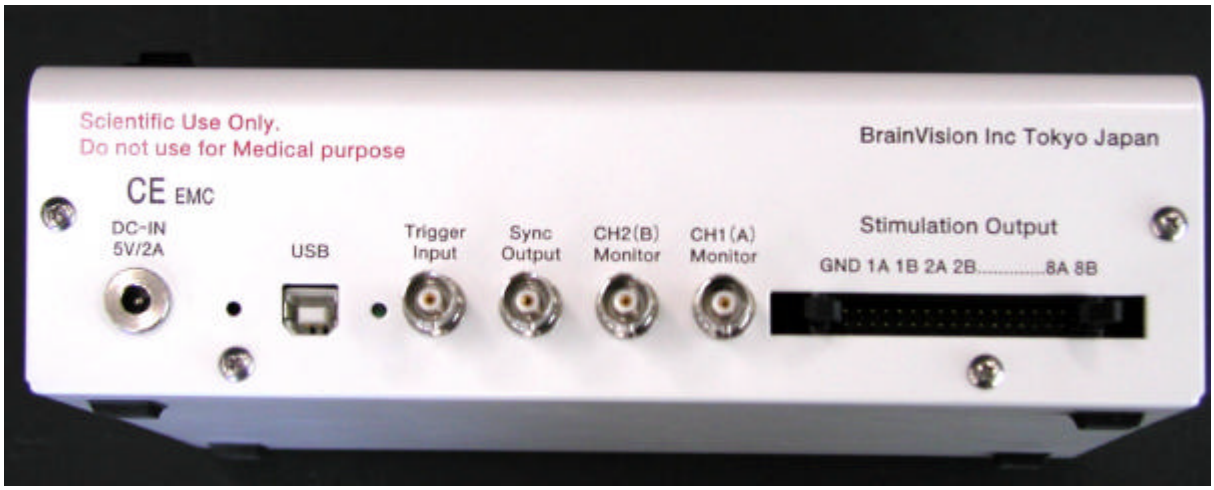
出力状態は電源投入時に ON 状態となり[出力状態表示ランプ]は点灯します。[出力 OFF ボタン（青）]を押すとランプが消え、出力が禁止されます。この状態でも内部のパルス発生器は動き続けています。[出力 ON ボタン（赤）]押せば、元通りの出力状態となります。[出力状態表示ランプ]が点滅している時は、ON/OFF ボタンは出力状態ですが、内部のソフトウェアによって出力が禁止されていることを示し、ON/OFF タイマー機能、間欠動作タイマー機能が設定に従って出力を禁止している場合です。

[出力確認ランプ]は 8 チャンネル全ての出力の OR 論理（どれかが 1 ならば１）で点灯します。従って、非同期の速い周期的出力であると点灯し続けます。低頻度のパルスの場合、暗く点滅して見えます。内部回路のパルス出力の確認用ですので、上記 ON/OFF ボタンで出力を OFF 状態にしても、点灯し続けます。

[同期確認ランプ]は通常点灯していますが、トリガ入力時に消灯します。トリガ入力のインバートです。[トリガボタン（緑）]を押すと手動トリガがかかります。このボタンは背面パネルのトリガ入力と論理 OR（どちらか一方が入力されるとトリガします）です。

特別な操作として、[ON ボタン（赤）]を押しながら、[トリガボタン（緑）]を押すとパルス列のリセットとして機能します。8 チャンネルの独立なパルス列の開始点を同期させることが出来ます。また、3 つのボタン全てを同時に押すとソフトウェアのアップグレードのダウンロードモードとなります。当社の担当より指示があるとき以外は 3 つ同時に押してはいけません。誤って押した時にはすぐに電源を切って下さい。

３－２　バックパネルのコネクタ類の説明



バックパネルには各種ケーブルのコネクタが配置されています。左から、

電源コネクタ：アダプタ（5V/2A 以上)を接続します。

USB コネクタ：PC と通信する時に使います。

ケーブルは付属していません。使用するには別売のソフトウェアが必要です。

BNC コネクタ：TriggerInput：トリガ入力　（外部機器からの同期入力）

2.5V 以上の入力で動作します。パネルの設定でパルス列の制御に使われます。

BNC コネクタ：SyncOutput：同期出力

3.3V の LVTTL 出力です。外部オシロのトリガ入力へ接続することで、アナログ信号モニターが同期します。アナログ出力よりも約 2μ秒先行して出力されています。

BNC コネクタ：CH2/1（B/A)Monitor：アナログモニター出力

正負 5V のアナログ信号で、外部オシロで出力信号をモニターするのに使います。実際の出力電圧の 1/5 の振幅で出力されます。出力チャンネルを変更するには、パネルから Monitor ボタンを押し、モニター出力ページでチャンネルを選択します。A/B チャンネルは下記の出力の A/B と同じ意味です。

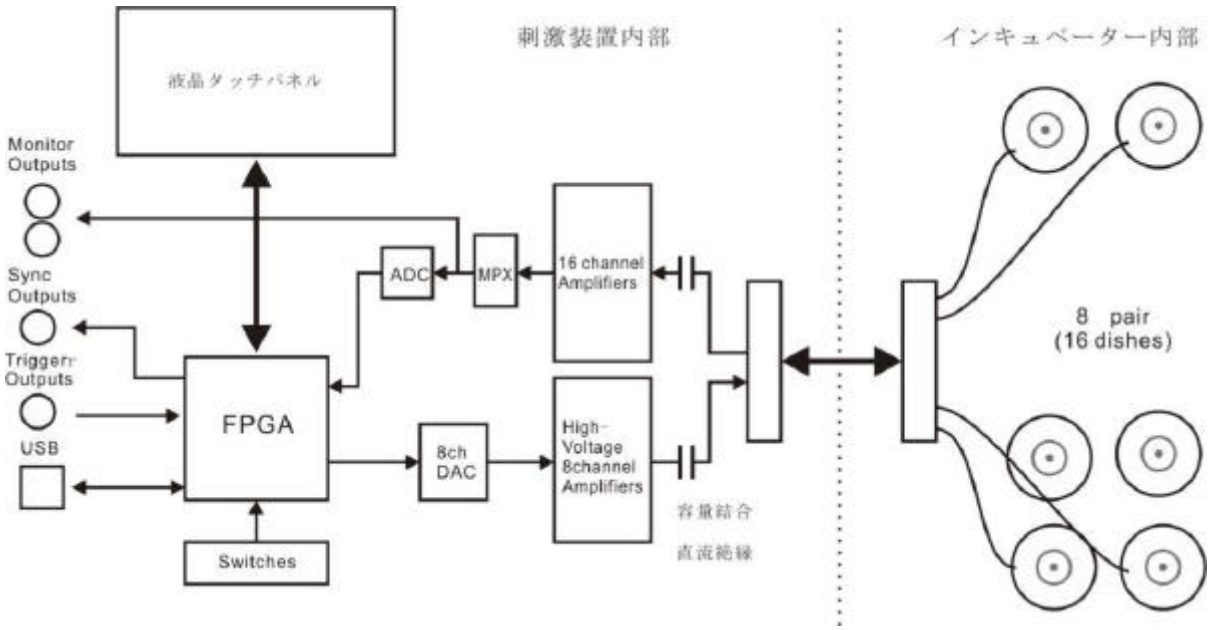
IDC コネクタ：StimulationOutput：刺激出力（電極端子台のコネクタへ）

2.54 ミリピッチのリボンケーブル用ヘッダーです。34 本のピンのうち、2 本がグランドで、32 本は出力信号です。この写真で左側 2 本がグランド、その右隣の 2 本がチャンネル 1 の A 出力であり、上側は差動出力の正極、下側が負極です。その右隣がチャンネル 1 の B 出力で、同様の順番で２A 、２B 、３A、３B と並び、右端が８B です。各チャンネルの A/B は同一のパルス発生器の出力を抵抗で単純に分配したものです（３－３参照)。

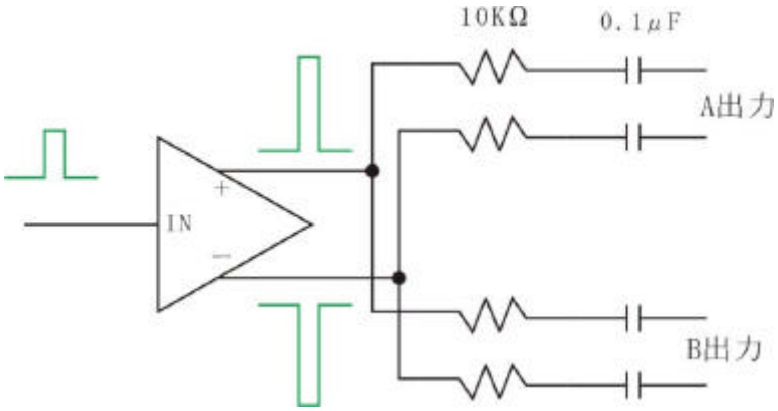
リボンケーブルを接続する時はコネクタの逆挿入防止のタブを下にして押し込み、両側のイジェクター（爪）を閉めてください。イジェクターを開くとコネクタは抜けます。

電源と刺激出力以外はオプションです。本体だけでご使用になる場合は外部機器やケーブルを接続する必要はありません。

３－３　内部回路の概要

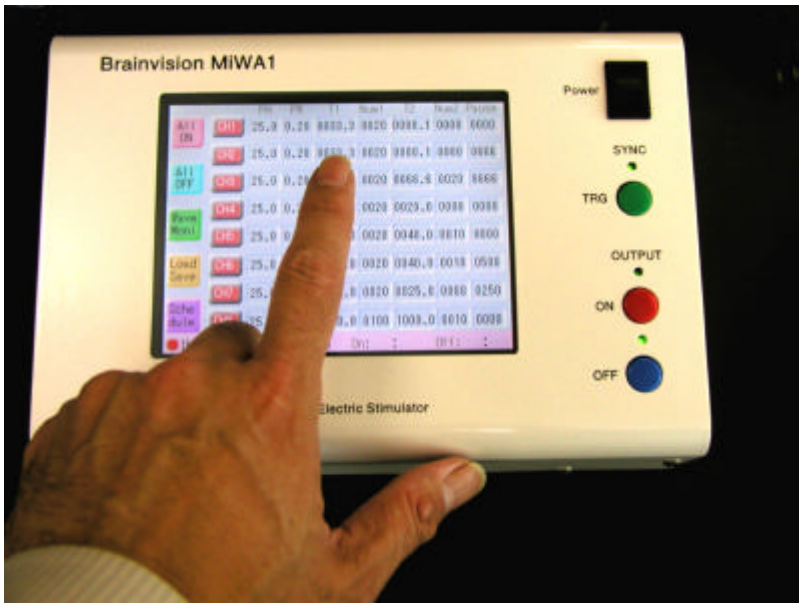


液晶タッチパネルにユーザーインタフェースに使われているソフトウェアが内臓されています。高速で正確なパルス発生機能は FPGA により実装されています。各チャンネルのパルス相互には 1μsec づつの遅れがありますが、いわゆるジッタ（不確定性）は極めて少ない回路です。８チャンネルの DAC で出力されたパルスは 8 チャンネルの差動出力増幅器を経てリボンケーブルを介してチェンバーの電極に接続されています。その出力を再度入力して選択し、アナログモニター出力、ADC により再度取込んで波形をパネルに表示します。例えば、出力端が短絡するとモニターの信号は消滅するので、短絡を知ることができます。



左図は各チャンネルの出力段の略図です。DAC が出力したパルスは差動出力アンプで非反転出力と反転出力になります。この信号を抵抗によって分岐して A/B 出力としています。直列抵抗値は各線で 10KΩであり、出力端間では直列になりますので、実質 20KΩになります。全ての出力には直流成分を除去する 0.1μF のコンデンサが直列に挿入されています。この回路は、独立の容器に入った溶液中での細胞刺激という用途では全く問題ありませんが、完全な絶縁方式ではないので、用途によっては注意が必要です。スライス試料等(*in vitro*)では多くのケースで問題はなく使用可能と思われますが、生体動物実験（*in vivo*）ではグランドに対して交流成分が流れますのでご使用になれないケースが多いと思われます。当社ではオプションで絶縁アンプを発売する準備を進めています。なお、人体への使用、医療用としての使用は許可されておりません。

4　パネル操作方法



液晶タッチパネルは画面のボタンや数字などのオブジェクトを軽く触れることで、感応して数値の設定や様々なモードにジャンプします。指先でチョンと触れる感じで正確な動作が期待されます。2 箇所以上が触れられた場合や広い面積が押された場合には判定できないことがあります。
操作確認のため、オブジェクトに触れるとピッという音がでます。

画面は Home ページから画面左のボタンによって、WaveMonitor、Load/Save、Schedule にジャンプします。また、設定数値をタッチすることで、Setup 画面にジャンプします。Keyboard 画面は Load/Save でコメントを入力するのに用います。Check 画面は Setup 画面で Check ボタンを押すと表示します。各画面で OK を押すと元の画面に戻り、最後には Home に戻ってきます。

5 分以上操作しないと省エネのため液晶を消灯します。パネルのどこかにタッチすると復帰します。

４－１　Home 画面

Home 画面の大半を占めるのは全チャンネルのパルス設定パラメータの一覧表示です。表は上からチャンネル 1、２の順で、各パラメータについては後述しますが、このエリアをタッチすると、Setup 画面に移動します。設定したいチャンネルの行で一覧の数字にタッチしてください。

左の 8 個のボタン（現在は赤表示）にチャンネル番号が表示されています。このチャンネル表示ボタンは各チャンネルの ON/OFF を個別にトグルするボタンです。

左端には、5 つのボタンがあります。内上の２つ、[All-ON]と[All-OFF]は全チャンネルを同時に ON/OFF するときに押すボタンです。

[Wave-Moni]（緑ボタン）は波形観測のための WaveMonitor 画面へのジャンプ、[Load-Save]（黄色ボタン）は設定を不揮発メモリへサーブ、ロードするためのページへジャンプします。[Schedule]（紫ボタン）は ON/OFF タイマーと間欠動作（IMW)の設定ページへジャンプするためのボタンです。

最下行の表示（薄紫バック部分）は、間欠動作（IMW)の状態表示と ON/OFF タイマーの状態表示、経過時間（時：分)、ON/OFF タイマーの設定値を表示しています。ON/OFF に数字がない場合、これらタイマーは設定されていないことを示します。状態表示は赤が ON 状態、白が OFF 状態を示します。2 つの状態の AND（両方とも ON の時）で出力パルスは ON になります。

４－２　Setup 画面

この画面で発生するパルス列をチャンネル毎に設定します。

左上の[Ch.1]という表示が設定を行うチャンネル番号を示します。右隣の[Copy-chN]は直前に設定したチャンネルから設定パラメータをコピーするためのボタンです。中央の数字がパルス設定パラメータであり、各数字をタッチするとその数字にフォーカスが移動します。フォーカスのある数字は左下の 4 つの矢印ボタンで値が変更できます。この矢印ボタンは数値の各桁を上下することが出来ます。上向き矢印でインクリメント、下向き矢印でデクリメントとなっています。タッチ続けると数字は連続的に増減します。1 つの数値設定が終わったら、次の数値をタッチしフォーカスを変えます。[Trigger]の設定は、トリガーモード表示（この例では Free-Run）をタッチすることで、次のモードに変更されます。パラメータ内容については５章で説明します。

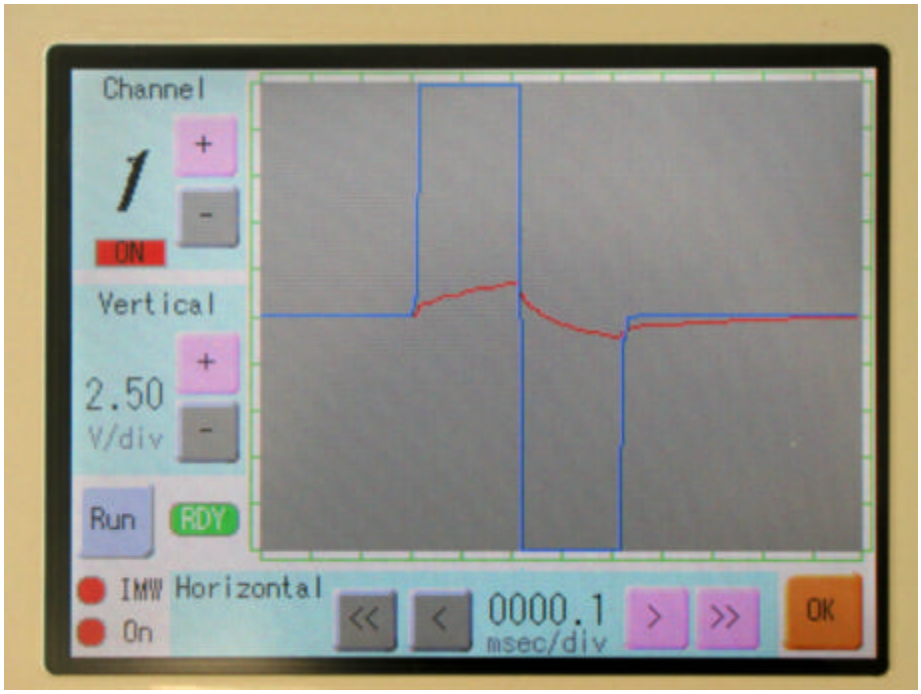
全ての数値の設定が終了したら、[Check]ボタンを押すと左図のような画面が現れます。

この画面で、設定が意図どおりであるか確認できます。周波数、ディレイ時間の合計、全体の時間などが計算されます。この画面で表示されるパルス図は固定で実際のパルス数や時間間隔を反映しませんのでご注意ください。ここで OK を押すと Setup 画面に戻ります。

Setup 画面で全てのパラメータ設定が終わったら、OK を押すと Home 画面に戻ります。この時点で設定した新しいパルス列が出力されています。また、次々にチャンネル設定を行う時には、左上のチャンネル表示にタッチすると、次のチャンネルに移動します。

＜４－３節、４－４節は追加予定機能のため予約されています＞

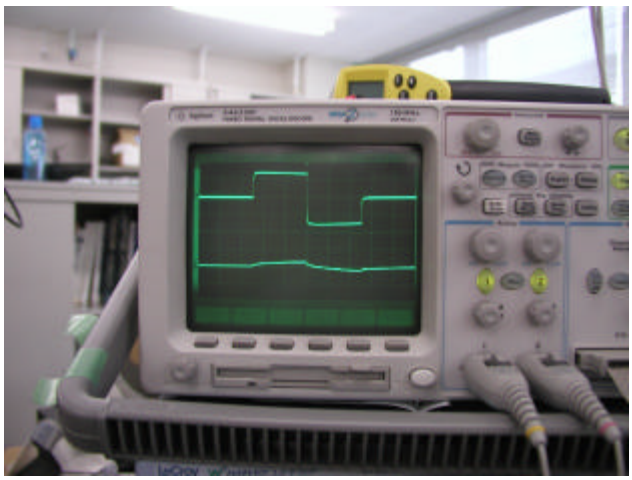
４－５　WaveMonitor 画面



この画面は簡易版のデジタルオシロです。中央に波形が表示され、各チャンネルの A 出力が赤、B 出力が青で表示されます。左の例では、A 出力のみにチェンバーが接続されています。B 出力には負荷がないので、出力したパルスがそのまま表示されています。

使い方は簡単です。左上のチャンネル選択の＋/－ボタンをタッチするとモニターするチャンネルが選択できます。この選択は外部オシロへの出力と共通です。Vertical は垂直軸（電圧軸）のスケールで 0.31V/div から 5.0V/div まで可変です。5.0V/div とは、目盛 1 つが 5.0V に相当するという意味で、縦には 10 目盛ありますので、フルスケールで 50V であることを意味します。Horizontal は水平軸（時間軸）のスケールを選択します。0,1msec から 1000msec/div まで可変ですが、この簡易オシロはサンプル点が 120 点のみですので、長時間の記録を選択すると歯抜けが起きます。主に短時間の記録でチェンバー電極の接続確認、抵抗の測定にご利用ください。波形からの抵抗の計算方法については後述します。

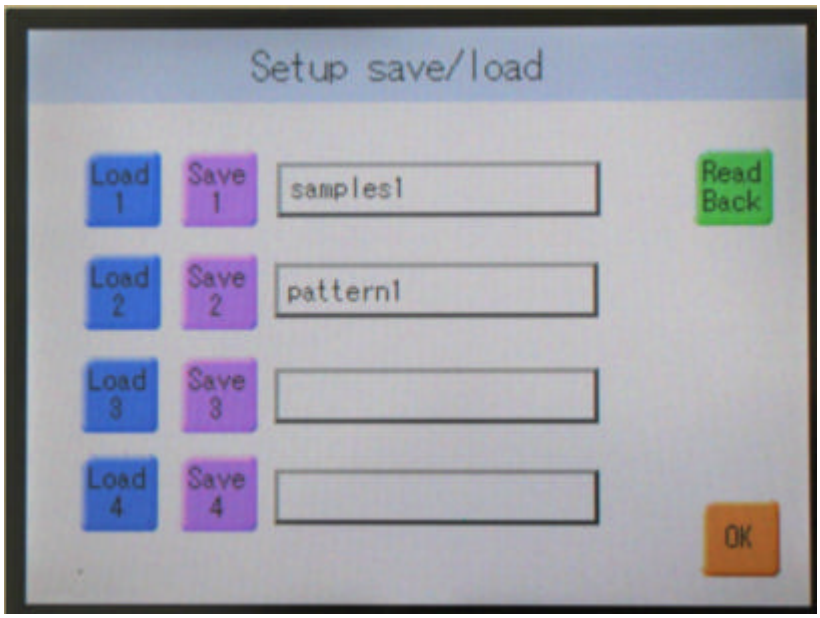
[Run]ボタンは連続的に取込みを継続する時に使います。[Run]を押すと表示は[Stop]に変わり、この状態で押すことで、取込みを中止できます。連続取り込みでない時には、どれかのボタンを押した時に 1 回のみ取込まれます。RDY という緑のランプは取込みが正常に行われたことを示すランプです。波形が出力されてない時に、取込みを開始してもトリガが発生しないので、RDY ランプはいつまでもグレー表示となります。　[Run]ボタンを押し連続取込みにすると、ボタン操作に対する応答が悪くなりますが、取込みや表示が繰り返されるのでボタン検出の処理が間引かれるのが原因で、故障ではありません。少し長めにボタンを押すと操作できます。



外部にオシロスコープなどを接続するとより精密なモニターが同時にできます。このとき縦軸は実際の電圧の 1/5 になっています。

新たにお求めの場合、Agilent 社の 54621A (Mega-Zoom 付き)を推奨します。

４－６　Load/Save 画面



パルス設定パラメータをフラッシュメモリに格納（セーブ）、あるいは、再取込（ロード）する時に使います。格納先は 4 バンクありますので、4 種の異なる設定を格納することができます。バンクに格納されるのは、パルス発生器の設定パラメータであり、その他の状態（タイマ設定など）は全体で 1 通りが格納されます。

（１）設定の格納

SaveN ボタンを押すと、現在のパルス発生器の設定パラメータが全チャンネルまとめて格納されます。格納する前に任意の名前をつけます。名前をつけるには文字箱にタッチしてください。KeyBoard 画面が現れます。普通の PC のキーボードと同じように入力することができます。配列は英語キーと似ていますが、若干異なります。一文字づつゆっくり入力して下さい。大文字や記号にするには Caps-Lock キーを押します。一度押すと、再度押すまで有効です。[CLR]は全部削除と[BS]は 1 文字削除です。入力が終了したら、[Enter]を押します。

（２）現在の状態の格納

この画面で OK を押すと、その時の状態が丸ごとメモリに格納されます。次に電源を投入した時に OK を押した時の状態がそのまま再現されます。

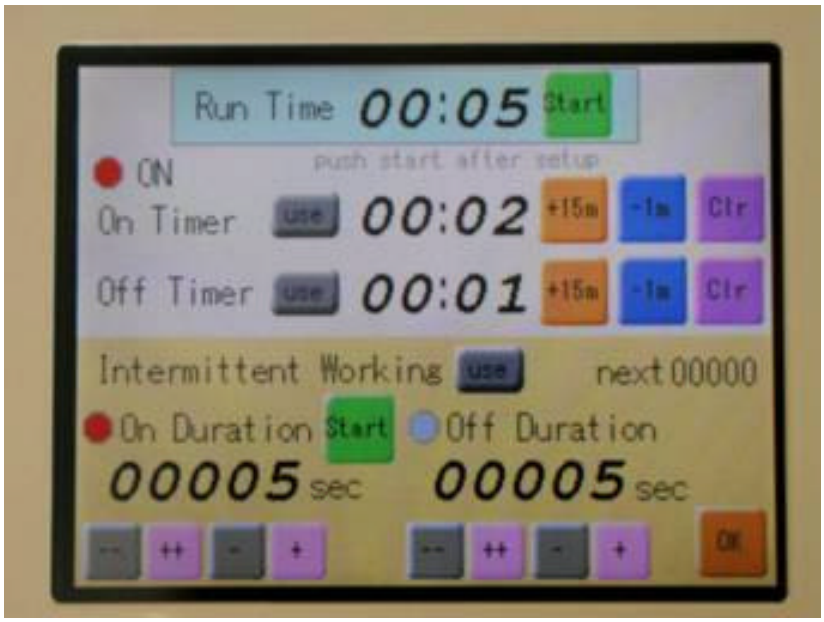
（３）設定のロード

LoadN ボタンを押します。ロード完了後、Home 画面に戻ります。

（４）現在の設定を読み出す

PC を併用している場合、PC から設定パラメータを操作すると、液晶パネルのコントローラが持つ状態と食い違います。[Read-Back]ボタンを押すと FPGA の設定が液晶パネル側に転送されます。従って、PC の設定結果をパネルに反映させることが出来ます。

４－７　Schedule 画面



上半分が ON/OFF タイマー、下半分が間欠動作用の設定オブジェクトです。
ON/OFF タイマーはスケジュールした時間が経過後に ON あるいは OFF するための長時間タイマーです。
間欠タイマー(IMW)は一定周期で刺激を ON/OFF させたい時に使うタイマーです。
このタイマー機能はパルス発生器の出力を禁止・許可することで制御します。

（１）ON タイマーの使い方

現在からある時間経過後に刺激を ON にしたい場合に使います。初めに On Timer 設定時間を＋15 分（橙)、-1 分（青)、Clr（紫）の時間設定ボタンで設定します。次に use ボタンを押します。Use ボタンは緑色に変わり、ON-Timer 予約状態であることを示します。最後に Start（緑ボタン）を押します。

（２）OFF タイマーの使い方

現在からある時間経過後に刺激を OFF にしたい場合に使います。Off Timer 設定時間を＋15 分（橙)、-1 分（青)、Clr（紫）の時間設定ボタンで設定します。次に use ボタンを押します。Use ボタンは緑色に変わり、Off-Timer 予約状態であることを示します。最後に Start（緑ボタン）を押します。

ON/OFF タイマーを両方 Use にすることで、ある時間経過後に ON、その後に OFF という予約もできます。タイマー時間を途中で変更する場合には、現時点で時間を再度決めて、最後に Start ボタンを押してください。ON/OFF タイマーは 1 度だけ動作します。再度、同一設定で動作させるには、Use を緑にして、Start ボタンを押します。

（２）間欠動作タイマーの使い方

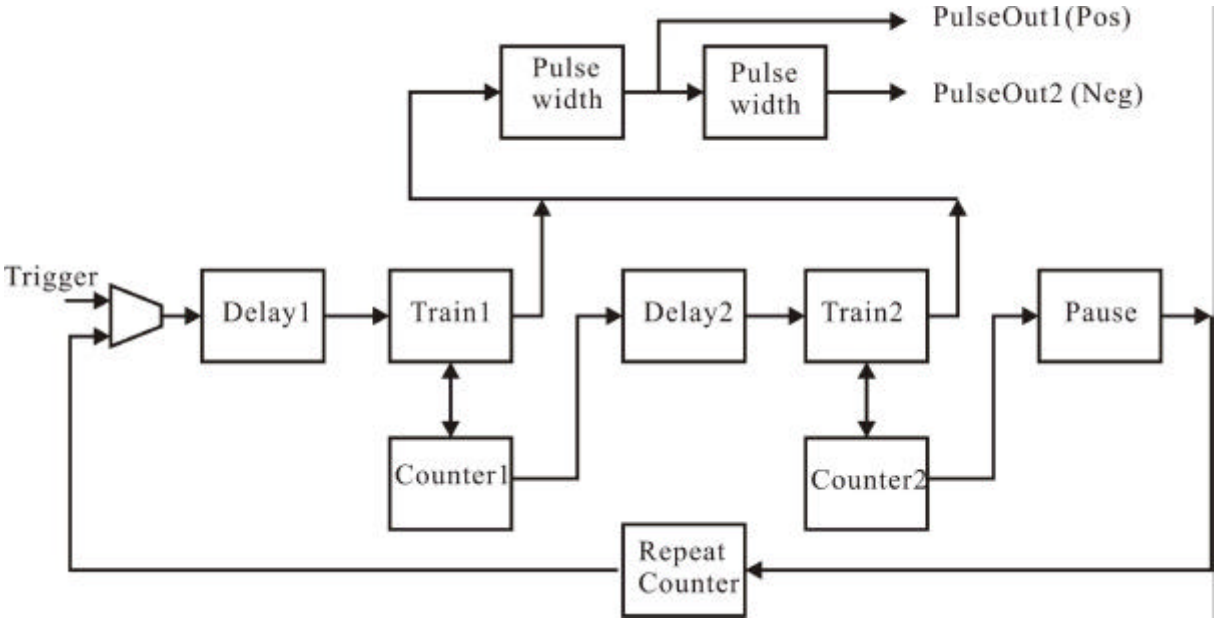
間欠時間の ON 時間と OFF 時間をそれぞれ秒単位で設定します。設定は数字の下の＋－ボタンを押すことで行います。ON と OFF は設定時間毎に繰り返されます。最大 65000 秒＝18 時間まで設定できます。Use ボタンを押し、緑色になれば動作開始となります。Start（緑ボタン）を押すと、ON の 0 秒から始まります。

５　パルス発生器の設定方法

パルス発生器は８チャンネル独立に動作します。基本的に２周期のパルスとポーズを組み合わせることで、様々なパルスを組み立てます。また、高度な設定として複数のチャンネルをトリガで連携させ複雑なパルス列を組み立てることも可能です。ここでは基本的な設定方法、典型的なパルスの設定実例、トリガを利用した複雑なパルス設計法の順で説明します。

５－１　基本的な内部回路

動作の理解を深めるため、パルス発生器の内部ブロック図を示します。



パルス発生器は、デジタル的に設定可能な遅延器とパルス数を計数するカウンタの組合せで構成されています。カウンタは下方の 3 個で他の７個は全て遅延器です。周期的なパルスは、遅延器とカウンタを組合せ、一定の遅延時間をフィードバックして繰り返すことで構成できます。ここで、Train1/2 の遅延器と Counter1/2 のカウンタは内部でフィードバックされ周期パルス発生器を構成しています。

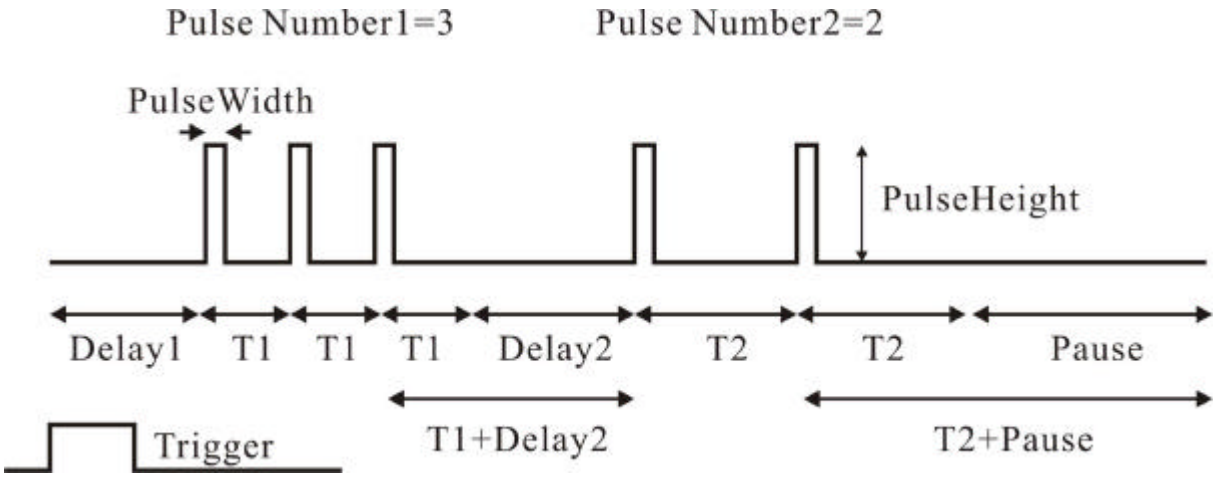
パルス発生器全体はトリガ（Trigger)と呼ばれるきっかけになる信号を基にしてスタートします。トリガ信号が入力されると、遅延器（Deley1)→周期パルス発生器（Train1 と Counter1)→遅延器（Delay2)→周期パルス発生器（Train1 と Counter2）→遅延器（Pause）の順序で連鎖的に動作します。その連鎖はリピートカウンタ（RepeatCounter)で計数されて設定値に達するまで、最初の遅延器にフィードバックされます。ここで、トリガを内部で自動的に発生させるとリピートカウンタの設定に関わらず、連続的なパルス発生となり、外部から供給すればトリガ同期したパルス列がとなってリピートカウンタの設定値でパルスは終結します。

Train1/2 の出力は図上部の 2 連のパルス幅遅延器（Pulse width)を作動させます。最初のパルス幅遅延器は正のパルスを発生させ、2 番目は負のパルスを発生させます。

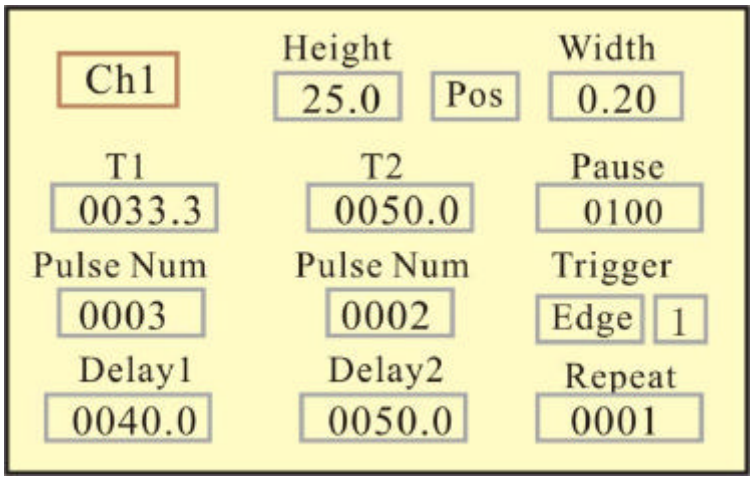
時間設定精度は遅延器に関するものが 0.1msec、パルス幅遅延器が 0.01msec、ポーズ遅延器のみ 1msec です。全体の繰り返し時間の精度はポーズを使う場合には 1msec となり、ポーズを使わない（0msec に設定）時は 0.1msec になります。

５－２　タイミング図

前節で説明した回路によって発生する基本的なパルス波形を設定パラメータと対応させて図にしたものです。



このパルス設定のパラメータのパネル画面（Setup 画面）での数値は下の図のようなものです。



パルスの振幅（Height）は 25V、極性は正（Pos)、パルス幅は 0.2msec です。最初の周期パルスは 33.3msec（T1）で３発、二回目の周期パルスは 50msec(T2)で 2 発です。それぞれ、40msec と 50msec の遅延（Delay1/2)だけ遅れます。最後に 100msec のポーズを置いて、リピートは 1 回ですので、繰り返さずに終結します。

ここで、もし遅延が不要なら、Delay1/2 を 0.0msec、Pause を 0msec に設定すれば 2 個のパルス列は間隔なく発生します。さらに、2 回目のパルスが不要なら PulseNum2 を 0 に設定します。もし、トリガ後に設定したパルス列を連続発生させるには、Repeat を 0 に設定します。ゼロは特別な数値で 0 回は意味がないので、無限連続を意味するようハード的に設計してあります。または、トリガモードの Edge を切替えて Run にしても同様に連続的にパルス列が発生します。Run に設定した場合はトリガが入力されない時でも自発的に発振します。

基本操作で使用するトリガモードは Run、Edge、Level 、Reset の 4 種です。この場合、右隣の数値（ここでは１）は関係ありません。Level はトリガ入力がエッジではなく連続な長時間続くスイッチ信号として割り当てられます。トリガが Hi レベル（2.5V 以上）の時パルスを発生します。Reset はトリガで連続発生しているパルスをリセットするモードです。その他のトリガモードは応用編で説明します。

５－３　簡単なパルスの設定例

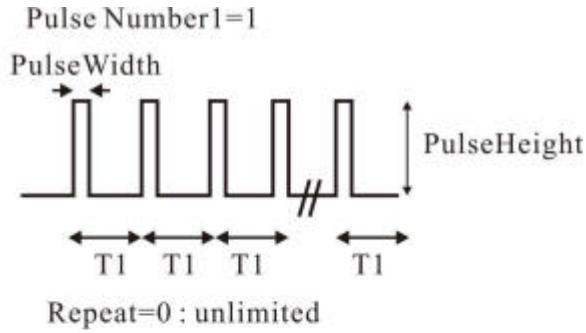
（１）50Hz の連続パルス

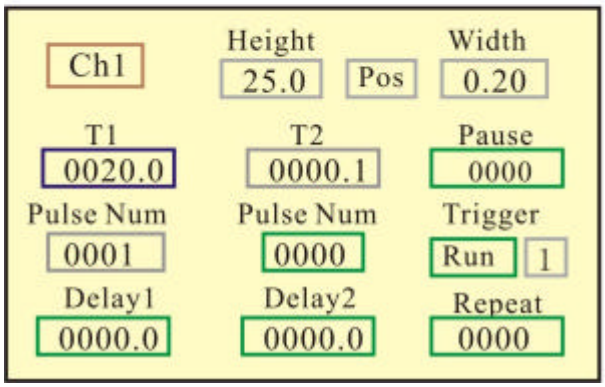
要点はパルスの周期を与える T1 を周波数の逆数で設定することです。周波数 F と周期 T の間には、

T（msec)＝1000 / F (Hz)

という簡単な関係があります。主な T と F は、

F（Hz)	**T(msec)**	F(Hz)	**T(msec)**
10	**100.0**	50	**20.0**
20	**50.0**	100	**10.0**
30	**33.3**	150	**6.7**
40	**25.0**	200	**5.0**





パルス数は連続ですので 1 以上ならばいくつでも構いません。

次に Repeat に 0 を設定することです。これで連続パルスの発生という意味になります。

その他の数値は不要なのでゼロにします。T2 は PulseNum がゼロならいくつでも影響しません。

（２）40Hz、20 発を 1 秒周期で繰り返すバーストパルス

バーストパルスを作るには、周期パルスの前後に空白期間を挿入します。その方法には、Delay1 を使うか、Pause を使うかです。この例では、Pause を使っていますが、Delay1 を 500.0 としても結果は同一です。

例えば、シータバースト様のパルスであれば、

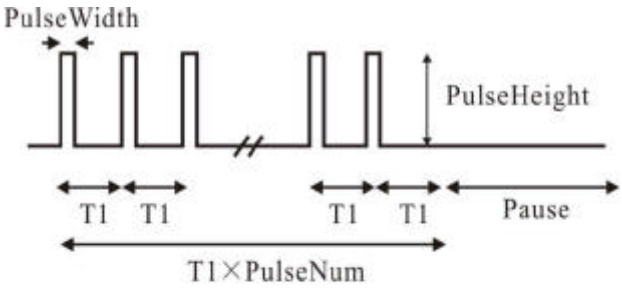
T1＝10.0msec

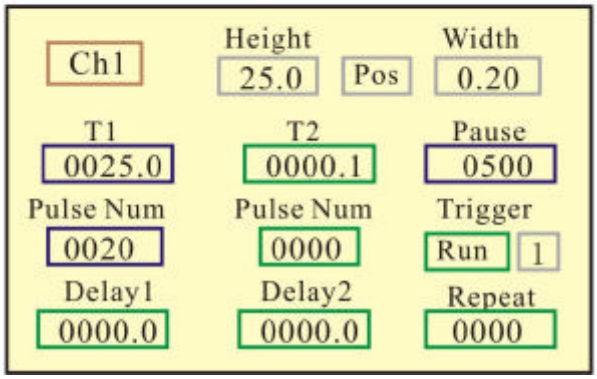
PulseNum=5

Pause=100msec

他は 0（T2 は何でも良い)

のような設定が適当でしょう。



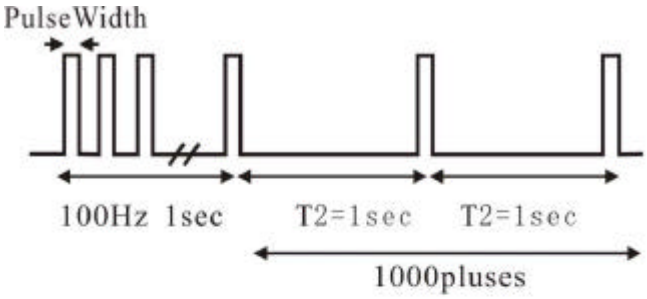


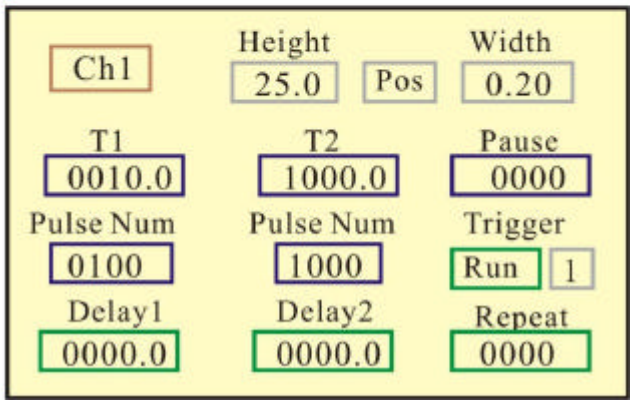
（3）LTP/LTD 繰り返しパルス

右図の設定は、一般的に海馬などで LTP 誘発に使われるテタヌスパルス（100Hz/1sec)と LTD 誘発に用いられる（1Hz/1000sec)を交互に繰り返すパターンです。

T2 の設定を 9999.9（約 10sec=0.1Hz)、T2 パルス数を 100 とすれば、LTD を起こさない同一時間間隔でテタヌスを起こすパターンとなります。

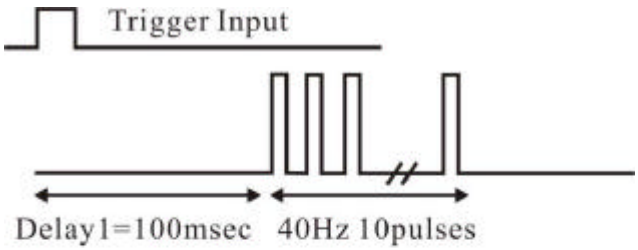
T2 パルス数を 9999 として、Trigger 設定を Run とせず、Reset とするとトリガ入力でテタヌスを発生、それ以外では１Hz あるいは 0.1Hz のテストパルスを与えるために使えます。

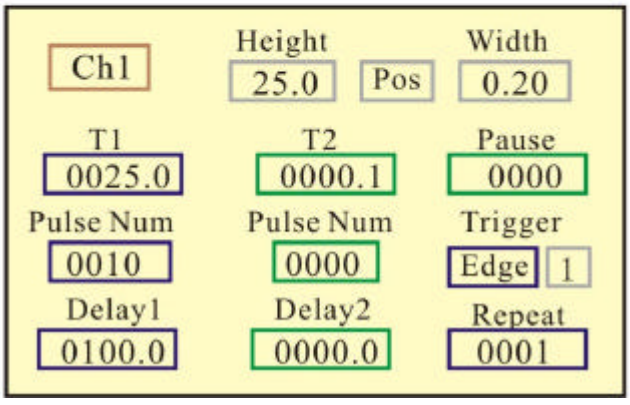




（4）観察用のパルス

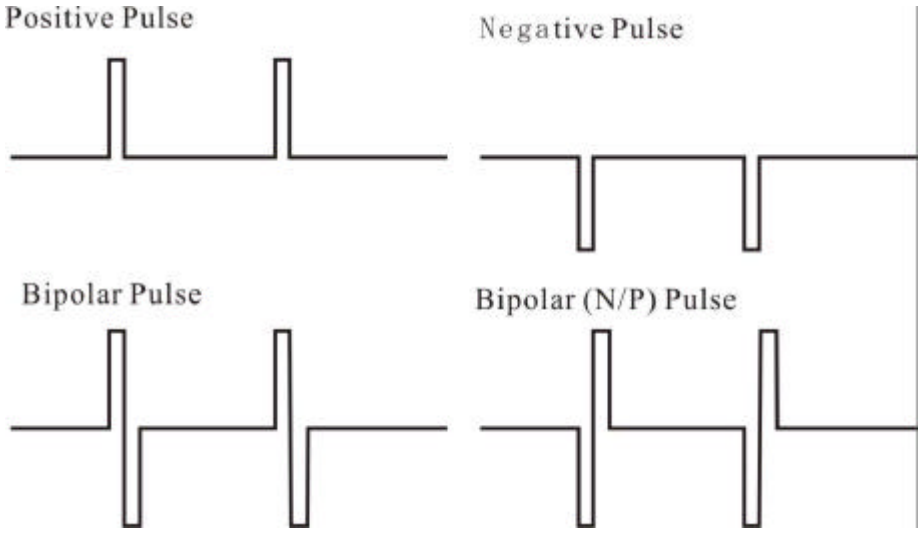
培養細胞の興奮性を測定する生理的な実験に用いる場合には、測定器との同期が大切です。例えば、イメージング装置の取込みを開始に同期してパルスを与えるというような用途です。本装置をスレーブする同期のために、Trigger を Edge としてください。適当な Delay1（ここでは 100.0msec）を前に置くことで、ベースラインを記録し、その後、適当な刺激パルスを与えます。この例では 40Hz 10 パルスです。この場合、Repeat は 0 とせず、必要な繰り返し数（普通は１）に設定します。





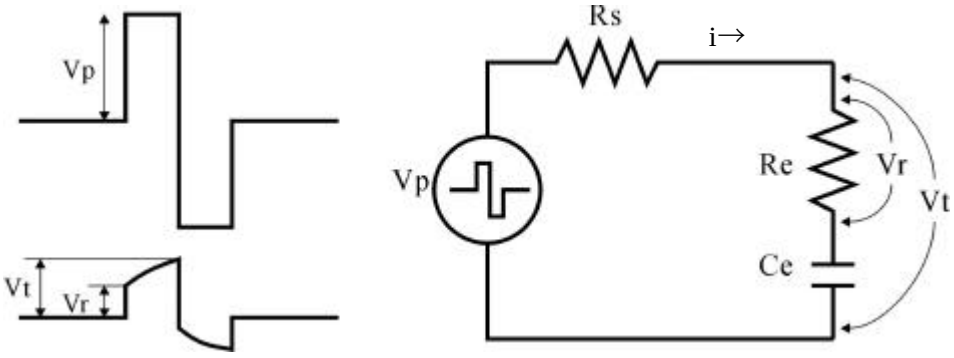
５－４　刺激パルスの設定

本装置で設定できる刺激パルスは次の 4 種類です。シンプルな正負パルスに加え、電極分極が起こりにくいバイポーラパルス（2 種）を発生させることが出来ます。設定はパルス振幅（Height)の数値の右隣のボックスを押すことで、Pos,Neg,Bip,N/P を選択します。特に周波数が高い刺激では電極が分極してしまうので、バイポーラを使用することを推奨します。なお、どちらの極性が適するかは細胞と電極の配置関係に依存することがありますので、実験的に確認してください。



パルス振幅、パルス幅に関しては、10Ｖ 0.25msec 当たりを出発点として、実験的に最適な設定をご自分で探してください。（培養液の量、電極表面の状態などに依存します。）

モニター波形から電極抵抗と刺激電流を求める方法について概説します。



パルス発生器、直列抵抗（Rs)、電極の等価回路（Re と Ce)とパルス発生電圧（Vp)、電極両端電圧（Vt)を左図に示しました。

電極は抵抗と容量の両方で構成されると考えます。抵抗の両端の電圧（Vr)は波形上のパルスでジャンプする部分に等しく、全体の電圧 Vt は、Ce が充電（分極）され時間と伴に大きくなります。Vr について考えると、Vp=i・(Rs＋Re)、Vr=i・Re が成り立ちます。ここで、Vp は設定電圧、Rs は 20KΩであり、Vr は観測波形から読み取ることが可能です。

これを変形すると、i=(Vp-Vr)/Rs であり、Rs=20KΩですので、

i [mA]＝(Vp [V] - Vr [V]) / 20、　Re [kΩ] =Vr [V] / i　[mA]　で計算できます。

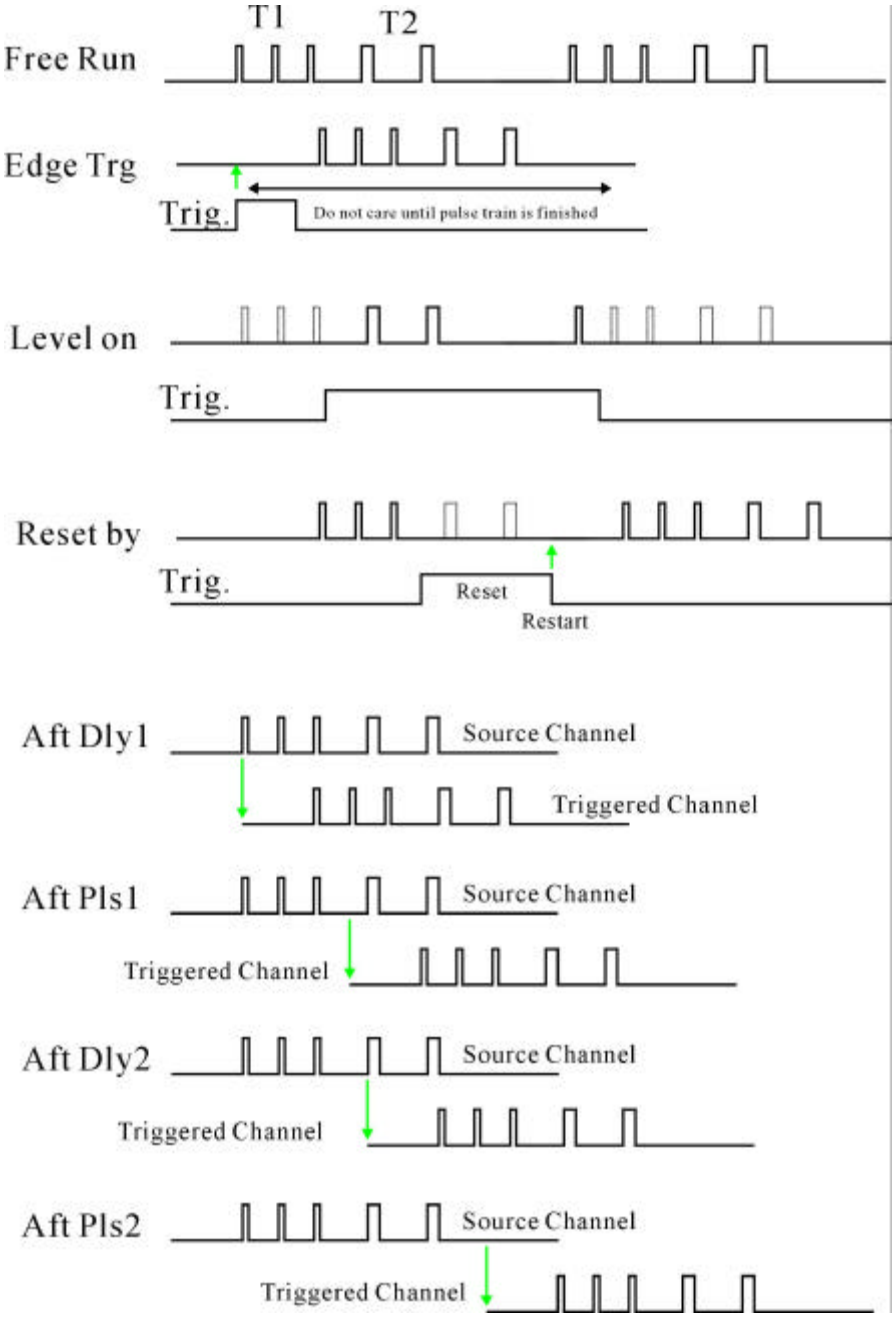
容量に関しては細かい説明は省きますが、

C　[μF]=　Pulse width [msec]　・(Vp / (Vt - Vr))　/ 20

で概数を求めることが出来ます。

５－５　トリガモードの設定

トリガモードは各チャンネル独立に設定可能です。



Free Run はトリガ入力とは無関係に自走します。
Edge Trg はトリガ入力でスタートします。
Level On はトリガ入力がある間だけパルスを出力します。
Reset By はトリガ入力でパルス列をリセットして、再スタートします。トリガ入力がない時は Free_run と同じ動作です。

チャンネル間にリンクを持たせるには Aft Dly1, Aft Pls1, Aft Dly2,Aft Pls2 を用います。 複数のチャンネルを連携させ、複雑なパルスを発生させることができます。例えば、Ch1 であるパルス列を発生させ、それが終了した時点で、Ch2 をスタートさせ、さらに Ch2 が終了したところで Ch3 をスタートさせるというようなパルス列です。この 4 つのトリガモードでは Trigger の設定数字が意味を持ち、トリガのソースになるチャンネルを表します。

５－６　複数のチャンネルを使った複雑なパルス発生

（以下機能はインプリメント中の拡張機能ですので、完成しておりません。）
このように連携したパルスをミキシングという手法で重ね合わせることで、複雑なパルス列を作ります。

５－７　正弦波、ランプ波の発生機能

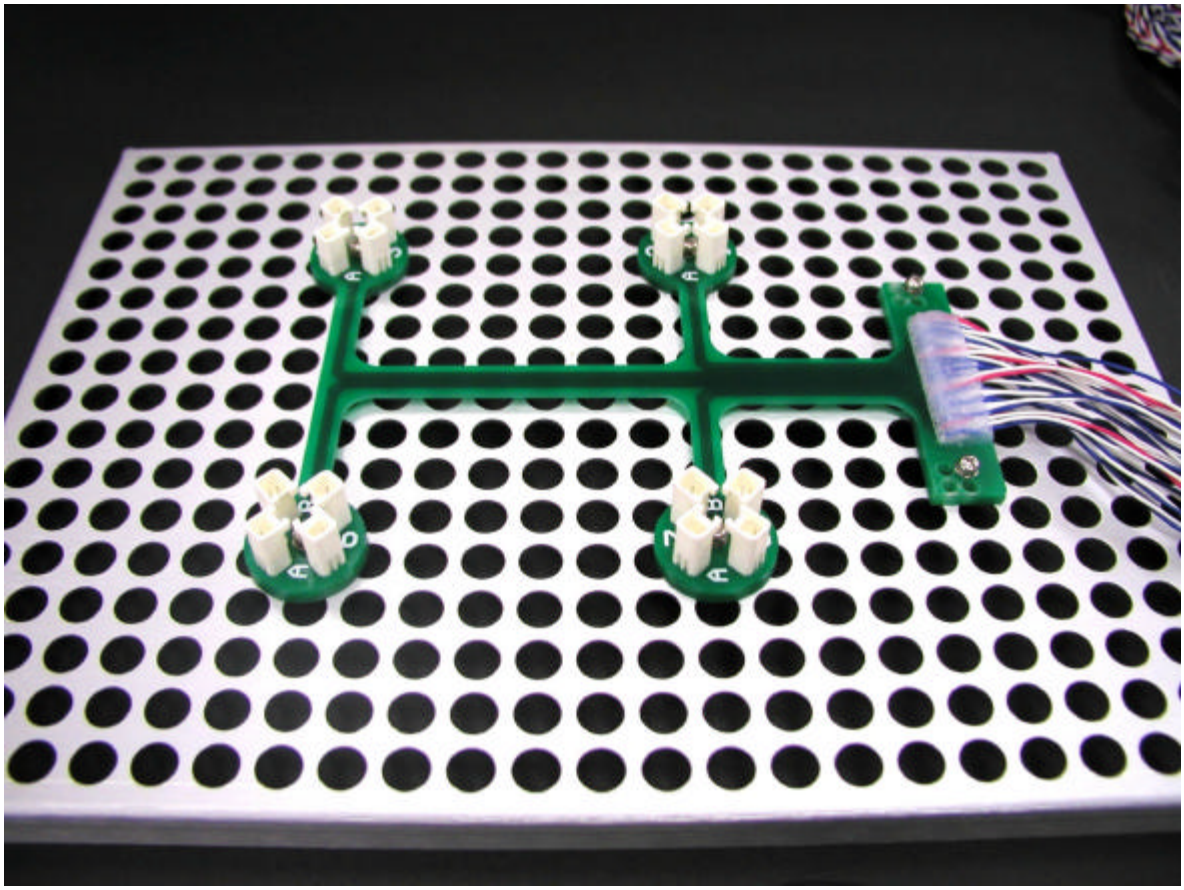
（以下機能はインプリメント中の拡張機能ですので、完成しておりません。）
1KHz までの正弦波やランプ波を発生させることが出来ます。これら波形は 100 ステップのテーブルで保存されており、パルス幅設定の時間の 100 倍が周期となる繰り返し波となります。正弦波の持続時間はパルス間隔 T1/2 とパルス数 Num１/2 の積で決まります。

６　チェンバーと端子台

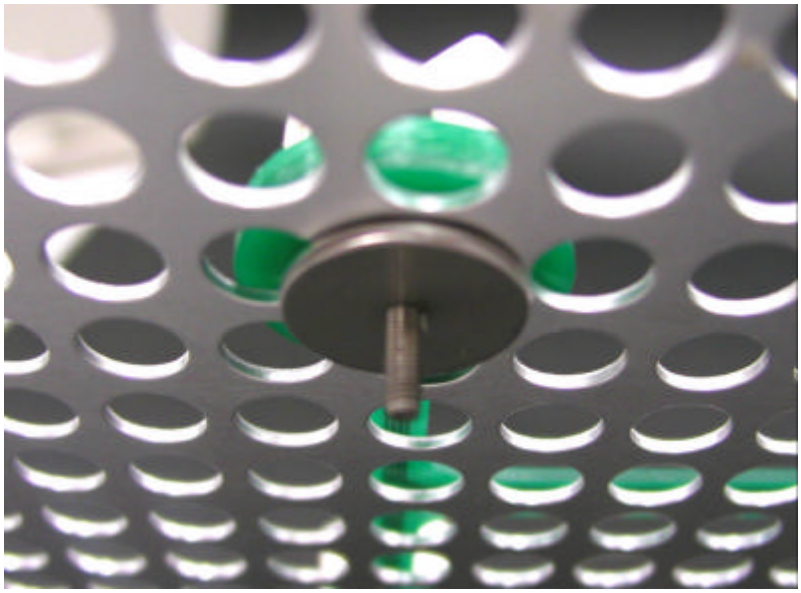
チェンバーと端子台はシンプルな構造ですので、ご覧になれば使用法についての細かな説明は必要ないかも知れませんが、いくつか注意すべきことがあります。

６－１　端子台の取付

端子台は必ず、付属のネジを用いてインキュベータの棚板にしっかり固定してください。



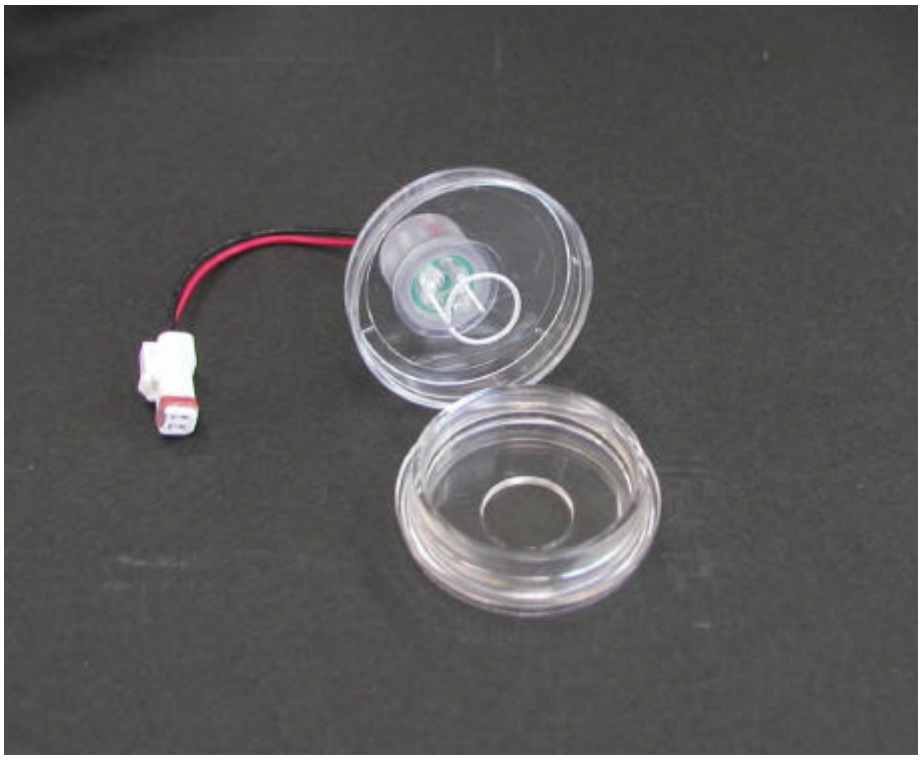
ネジは棚板の下で写真のように締め付けます。



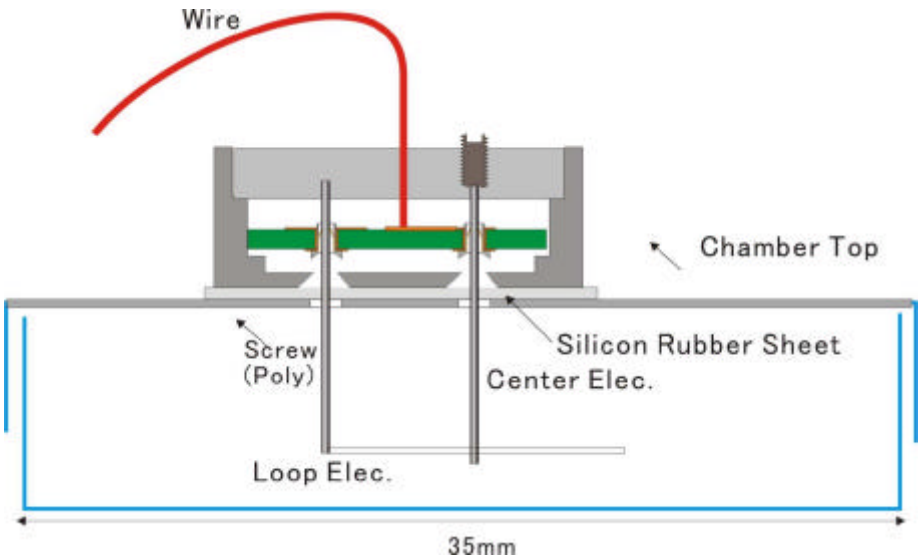
必ず６箇所全てを固定ください。数種のインキュベータの棚板を調べ、どの棚板にもネジが貫通するように設計しました。

６本のネジが穴を通るように取付場所を工夫してください。場合によっては斜めに取り付けと丁度よいかも知れません。

６－２　チェンバー

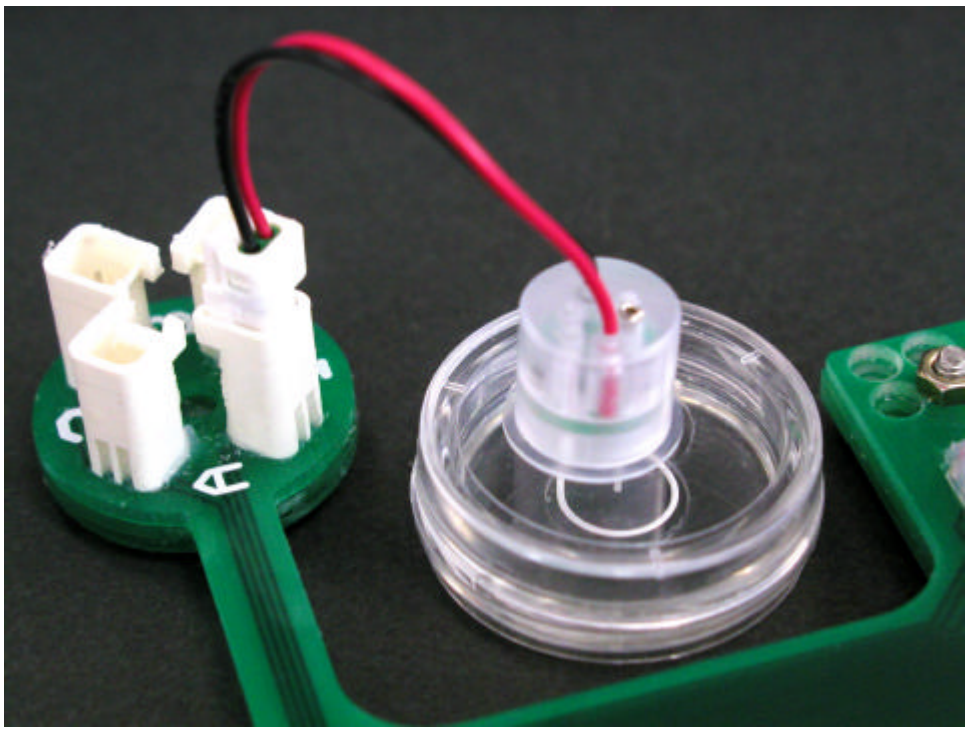


チェンバーを開いた様子です。蓋の部分にループ電極と針電極が固定されています。電極は動きますので、ラジオペンチやピンセットで位置を調整してください。また、引き抜くことが出来き、交換することが出来ます。電極が曲がってしまったり、被覆が剥けてしまった時には交換してください。なお、電極は高純度白金（999）であり、リサイクルすべき資源です。壊れた電極を当社にご返送頂いた場合、新品電極の代金から白金地金分を割引いたします。



左はチェンバー上部の構造図です。最上部のイモねじを時計周りに回転させると中心電極を押し出す構造になっています。（１回転で0.4mm 押し出します）反対方向に回しても戻ることは出来ません。従って、電極はイモネジを緩めた状態で、電極を差し込み、ネジで押し出して、丁度良い高さに調整してください。ネジ部から内部に水分が入らないように、調整がすんだら、パラフィルムやテープなどをネジの上に貼ってください。

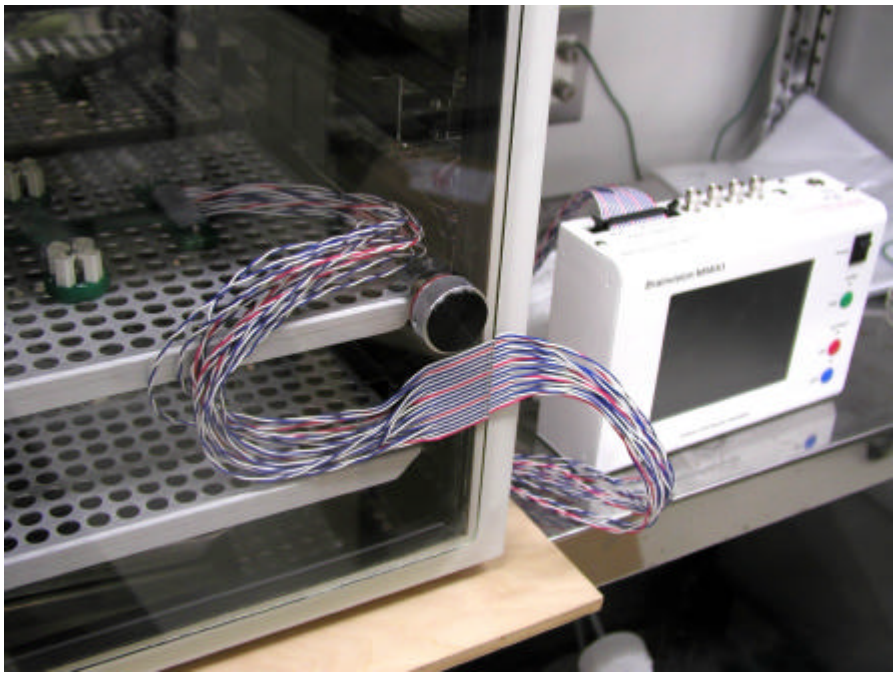
ユーザーが必要な容器に電極を取り付けるときは、４つの穴を蓋部分に空ける必要があります。付属（試作品にはありません）のゲージを使い、電極穴は１mm、ネジ穴は２mmが適当です。シリコンゴムパッキンが痛んだときには、市販のシリコンゴムシートを丸く切って、針で穴を開けて下さい。



端子台のコネクタにワイヤーを接続した様子です。

ここで注意して欲しいのは、ワイヤーの反発で容器の蓋が開いてしまうことです。
そのような場合、ワイヤーを指でしごくようにして曲げ、下向きの力が働くように形を整えてください。ワイヤーについては今後、柔らかい素材に変更予定です。
それでも何らかの原因で蓋が浮いてしまうことがあるので、安全のため小さく切ったテープを容器側面に貼り、蓋を軽く固定すると良いでしょう。

６－４　インキュベータにケーブルが通る穴がないとき



写真はリボンケーブルをインキュベータ前面ドアのゴムパッキンに挟んだ様子です。隙間が空くようならケーブル以外の部分に隙間止めテープ（ホームセンターなどでいろいろ売っています）を貼るなどの方法で隙間を埋めてください。詳しくはインキュベータメーカーにご相談ください。